

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-327594

(43)Date of publication of application : 13.12.1996

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

(21)Application number : 07-155401

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 29.05.1995

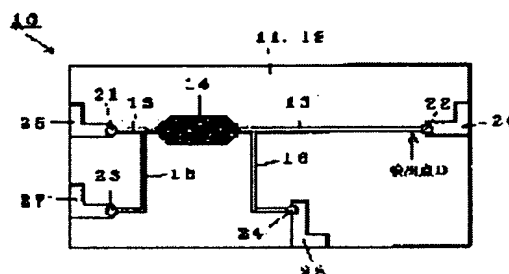
(72)Inventor : ARAI AKIHIRO

## (54) CAPILLARY ELECTROPHORETIC CHIP

## (57)Abstract:

PURPOSE: To perform analysis in a short time without requiring a number of stages of cleaning-up operations comprising solvent extraction, etc., even in the case of living body samples.

CONSTITUTION: In this capillary electrophoretic chip 10, a wide holding part 14 packed with a packing material for pretreatments is provided in the center of a migration groove 13, and branching grooves 15, 16 are provided in the portions of the migration groove 13 in front of and behind the holding part 14. At the first stage, a component for analysis is held in the packing material in the holding part 14, and at the second stage it is eluted and separated through electrophoresis inside the migration groove 13.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 23.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3477918

[Date of registration] 03.10.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-327594

(43)公開日 平成8年(1996)12月13日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 27/447

識別記号

片内整理番号

F I  
G 0 1 N 27/26

技術表示箇所

3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平7-155401

(22)出願日 平成7年(1995)5月29日

(71)出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72)発明者 荒井 昭博

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会  
社島津製作所三条工場内

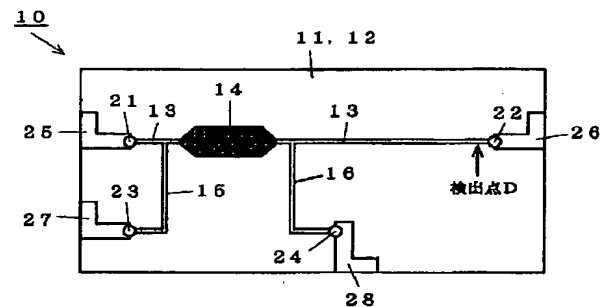
(74)代理人 弁理士 小林 良平

(54)【発明の名称】 キャピラリ電気泳動チップ

(57)【要約】

【目的】 生体試料に対しても溶媒抽出等による多段階のクリーンアップ操作を必要とせず、短時間で分析を行なえるようにする。

【構成】 キャピラリ電気泳動チップ10において、泳動溝13の中間部に前処理用充填剤を充填した幅広の保持部14を設けるとともに、保持部14の前後の泳動溝13に分岐溝15、16を設ける。第1段階で分析目的成分を保持部14の充填剤に保持させておき、第2段階でそれを溶出させ、泳動溝13で電気泳動分離する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 対の略同形の平板を備え、少なくとも一方の平板の表面に泳動溝が形成され、他方の平板の該泳動溝の端に略対応する位置にそれぞれ貫通孔が設けられ、両平板が泳動溝を内側にして張り合わされて成るキャピラリー電気泳動チップにおいて、泳動溝の中間部に前処理用充填剤を充填した幅広の保持部を設けるとともに、保持部の前後の泳動溝に分岐溝を設けたことを特徴とするキャピラリー電気泳動チップ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、キャピラリー電気泳動チップに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 キャピラリー電気泳動法 (CE) は、ペプチド、タンパク質、核酸、糖等の生体成分の分析の他、光学分割、同位体の分離等、極めて近い成分を高速で分離するに適した方法であり、臨床診断や医薬品、環境物質のモニタリング等に広く利用される。

【0003】 細管を利用したキャピラリー電気泳動法は分離度が高く、しかも、溶媒や試料の消費量が極めて少ないという利点がある一方、このように試料の量が微量であるため、濃度感度が高速液体クロマトグラフ (HPLC) の  $1/10 \sim 1/100$  程度と低く、検出感度がキャピラリーの内径に依存するという欠点がある。また、キャピラリーの内表面の状態は泳動液によって敏感に変化するため、泳動液を交換する際には十分なコンディショニング作業が必要である。このコンディショニング作業を簡略化するために泳動液毎にキャピラリーを準備しておくことも可能であるが、この場合にはキャピラリー毎にその履歴を管理しておく必要がある。

【0004】 このような問題点を解決するため、キャピラリー電気泳動チップが開発された。これは図 7 に示すように、1 対の透明平板 (ガラス板、石英板等) 51、52 から成り、一方の透明平板 52 の表面に泳動用のキャピラリー溝 54、55 を形成し、他方の透明平板 51 のその溝 54、55 の端に対応する位置にリザーバ 53 を設けたものである。その使用法は次の通りである。両透明平板 51、52 を図 7 (c) に示すように重ね、いずれかのリザーバ 53 から泳動液を溝 54、55 の中に注入する。そして、短い方の溝 54 の一方の端のリザーバ 53 に試料を注入し、その溝 54 の両端のリザーバ 53 に電極を差し込んで所定時間だけ高電圧を印加する。これにより、試料は溝 54 の中に分散される。次に、長い方の溝 55 の両端のリザーバに電極を差し込み、泳動電圧を印加する。これにより、両溝 54、55 の交差部分 56 に存在する試料が溝 55 内を電気泳動する。従って、溝 55 の適当な位置に紫外可視分光光度計、蛍光光度計、電気化学検出器等の検出器を配置しておき (この部分が検出セルとなる)、分離成分の検出を行なうことに

より、試料の分析を行なうことができる。

【0005】 このように、キャピラリー電気泳動チップは、2 枚のガラス板にマイクロマシニングで溝や孔を形成するのみで、電極、検出セル、リザーバ等が一体化された電気泳動装置が構成されるため、大量生産が可能であり、非常に低コストで製造することができる。このため、各泳動液、或いは各試料・各分析条件毎にチップを用意しておくことができ、分析条件の変更等が極めて簡単に且つ短時間で与えられるという特長を有する。

## 10 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 細管を使用する電気泳動或いは上記チップによる電気泳動のいずれの場合も、血漿、血清、尿などの生体試料中に存在する薬物をキャピラリー分析しようとする、タンパク質、脂質等の複雑なマトリックスがキャピラリー内面に吸着され、流路内壁の物理的・化学的状態が変化して、分離に影響を及ぼす。また、タンパク質のピークは一般に広がり易いため、分析目的成分のピークと干渉し、分析を妨害する。

【0007】 このような問題を避けるため、従来、生体試料のキャピラリー分析を行なう場合は予め、溶媒抽出などによる多段階のクリーンアップ操作を行なう必要があったが、これは非常に時間のかかる、面倒な作業であった。

【0008】 本発明はこのような課題を解決するために成されたものであり、その目的とするところは、生体試料に対しても溶媒抽出等による多段階のクリーンアップ操作を必要とせず、短時間で分析を行なうことのできるキャピラリー電気泳動チップを提供することにある。

## 【0009】

30 【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するために成された本発明に係るキャピラリー電気泳動チップは、1 対の略同形の平板を備え、少なくとも一方の平板の表面に泳動溝が形成され、他方の平板の該泳動溝の端に略対応する位置にそれぞれ貫通孔が設けられ、両平板が泳動溝を内側にして張り合わされて成るキャピラリー電気泳動チップにおいて、泳動溝の中間部に前処理用充填剤を充填した幅広の保持部を設けるとともに、保持部の前後の泳動溝に分岐溝を設けたことを特徴とするものである。

## 40 【0010】

【作用】 保持部には、サイズ排除用充填剤等の機能性充填剤を充填しておく。泳動溝、保持部及び分岐溝に泳動液を満たし、保持部の前に設けられた分岐溝の一端に試料を入れる。そして、分岐溝の両端に電圧を印加することにより、試料を保持部に流入させる。試料中の低分子量である分析目的成分は保持部の充填剤により保持され、高分子量のマトリックス成分はそこを通過して保持部の後に設けられた分岐溝へ流出する。所定の時間が経過した後、分岐溝両端への電圧印加を停止し、泳動溝の両端に泳動電圧を印加する。これにより、保持部の充填

剤に保持された分析目的成分が泳動溝に流出し、泳動溝において電気泳動分離が行なわれる。

【0011】なお、電気泳動分離はチップ内の泳動溝で行なってもよいし、チップに接続した細管を泳動路とするようにしてもよい。この場合はチップ外で検出を行なうため、平板は透明でなくてもよく、例えばエッチング加工の容易なシリコン板を使用して、溝等の泳動液が接触する面に酸化絶縁加工を行なうようにしてもよい。ただし、後述する実施例のようにチップ内で検出を行なう場合は、少なくとも一方の平板は透明であることが望ましい。

#### 【0012】

【発明の効果】本発明に係るキャピラリー電気泳動チップでは、泳動溝の中間に充填剤を充填した保持部を設け、これにより試料から分析目的成分以外の不要夾雑成分を予め排除できるようにしている。このため、従来のような溶媒抽出等による多段階のクリーンアップ操作が不要となり、分析時間が大幅に短縮され、また、操作も簡単となる。

#### 【0013】

【実施例】本発明の一実施例であるキャピラリー電気泳動チップを図1～図6により説明する。図7に示した通常のキャピラリー電気泳動チップと同様、本実施例のキャピラリー電気泳動チップ10も図2に示すように2枚のガラス板（石英板でもよい）11、12で構成される。

【0014】図1及び図2に示すように、下側のガラス板12には泳動溝13が形成され、その中間やや一方の端に近い方には幅広の保持部14が形成されている。また、保持部14の両端からはそれぞれ分岐溝15、16が設けられている。これら泳動溝13、分岐溝15、16及び保持部14は、ガラス板12の表面にエッチングにより形成され、溝部分13、15、16の幅が10～100μm程度、深さが5～50μm程度となるように形成される。また、エッチング加工により形成する場合、保持部14の深さは溝部分13、15、16と同じとし、幅を広く（数mm程度）する。なお、これらはもちろんエッチングではなく、機械加工で形成してもよい。この場合、保持部14の深さを深くすることも可能である。

【0015】上側のガラス板11の、上記泳動溝13の両端及び両分岐溝15、16の非接続端にはそれぞれリザーバ用の貫通孔21、22、23、24を穿孔する。

【0016】下側のガラス板12又は上側のガラス板の表面には、これら貫通孔21、22、23、24を穿孔した箇所とそれに最も近い端面とを接続する薄膜電極25、26、27、28を設ける。薄膜電極25、26、27、28は、金属の蒸着等により形成することにより、両ガラス板11、12の間に隙間を作らないようにする。

【0017】下側のガラス板12の表面に形成した保持

部14には、図3に示すように、充填剤30を充填する。充填剤30としては、目的に応じて例えば、(1) ODSシリカ表面にタンパク質を非可逆的に吸着させたタンパク質コートODS、(2) サイズ排除メカニズムでタンパク質が分配結合相と接触するのを防ぐために考えられたISRP (Internal Surface Reversed Phase) やSHP (Shielded Hydrophobic Phase)、(3) 免疫反応により抗原（又は抗体）だけに特異的に結合し、pHを変えて溶解させる抗体固定化カラム充填剤（又は抗原固定化カラム充填剤）、等を使用することができる。なお、T.C. Pinkerton, "High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection", J. Chromatogr., 544, 13(1991)にこのような機能性充填剤についての詳しい解説がある。

【0018】泳動溝13と保持部14の境界部分には、充填剤30の流出を防止するため、ガラス粉末を焼結したフリット31、或いは図5に示すようなエッチング形成による障害物38を設ける。

【0019】各ガラス板11、12について上記の加工を行ない、保持部14に充填剤30を充填した後、溝13、15、16を形成した面が内側となるように両ガラス板11、12を貼り合わせ、熱又は陽極接合により固定する。これにより、上側のガラス板11の貫通孔21～24はリザーバとなる。

【0020】こうしてキャピラリー電気泳動チップ10を形成した後、図4に示すように、各薄膜電極25～28をスイッチボックス35の各スイッチS1～S4を介して高圧電源(HV)36及びアースに接続する。

【0021】本実施例のキャピラリー電気泳動チップを用いた分析の手順は次の通りである。まず、いずれかのリザーバから泳動液を加圧注入し、泳動溝13、保持部14及び両分岐溝15、16に泳動液を満たす。そしてシリンジにより、保持部14の前に設けた分岐溝15の端部のリザーバ（試料注入点）22から所定量の微量の試料を注入し、スイッチボックス35のスイッチS2及びS3を閉じる。これにより、高圧電源36からの高電圧が分岐溝15、保持部14及び分岐溝16の間に印加され、リザーバ22に注入された試料がこれらの流路を流れて行く。この間、試料中の不要夾雑成分は保持部14を通過して他方の分岐溝16からリザーバ23へ流れて、そこからドレイン（図示せず）へ廃棄される一方、分析目的である低分子量成分は保持部14の充填剤30に保持される。

【0022】血清試料の場合、充填剤30として例えば上記(1)のタンパク質コートODSを用いると、血清タンパク質は保持部14をそのまま通過し、分析目的成分である血清中の薬物や代謝物などは細孔内のODSシリカに分配され、そこで保持される。

【0023】次に、泳動溝13の端部のリザーバ（溶離

(4)

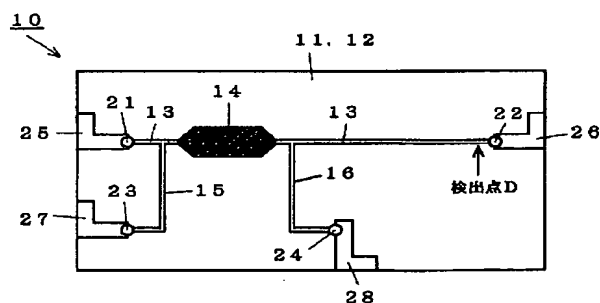
5

バッファ注入点) 21より有機溶媒(上記例の場合、70%程度のアセトニトリル)を含む溶離液をシリンジ等で注入し、スイッチボックス35のスイッチS2、S3を開いてスイッチS1、S4を閉じる。これにより、保持部14の充填剤30に保持された成分が泳動溝13に溶出し、泳動溝13において電気泳動による成分分離が行なわれる。溶離成分は検出点D(図1)において検出される。なお検出は各種方法を採用することができるが、例えば図6に示すように、検出点Dの泳動溝13にレーザ光を照射し、励起された溶離液から発生する蛍光を観測するという方法をとることができる。このとき、レーザ照射効率の点から、光源40から検出点Dまでは光ファイバ41で導光することが望ましく、また、蛍光検出の感度を上昇させるため、蛍光検出器(図6の場合はフォトマル42)の前に空間フィルタ及び干渉フィルタを設けることが望ましい。

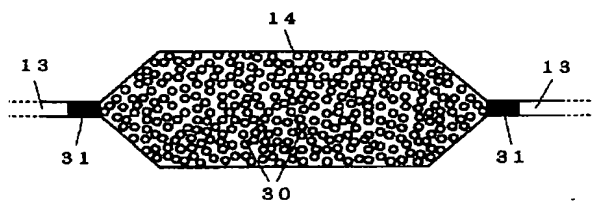
【0024】別の例として、上記(3)の抗体固定化カラム充填剤を用いる場合は、第1段階において、注入した試料成分のうち抗体と特異的に相互作用するもののみが保持部14において充填剤30に保持され、それ以外はドレインに排出される。第2段階では、酸性のバッファ液を溶離バッファ注入点21から導入することにより、保持されていた分析目的成分が保持部14から泳動溝13に溶出し、泳動溝13において分離、検出される。

【図面の簡単な説明】

【図1】



【図3】



6

【図1】 本発明の一実施例であるキャピラリ電気泳動チップの平面図。

【図2】 実施例のキャピラリ電気泳動チップの端部の拡大断面図。

【図3】 実施例のキャピラリ電気泳動チップの保持部の拡大平面図。

【図4】 実施例のキャピラリ電気泳動チップの周辺の回路図。

【図5】 保持部における充填剤保持のための機構を示す拡大斜視図。

【図6】 検出機構の説明図。

【図7】 保持部を持たないのキャピラリ電気泳動チップの構成を示す平面図(a)、(b)及び断面図(c)。

【符号の説明】

10…キャピラリ電気泳動チップ

11、12…ガラス板

13…泳動溝

14…保持部

20 15、16…分岐溝

21、22、23、24…リザーバ(貫通孔)

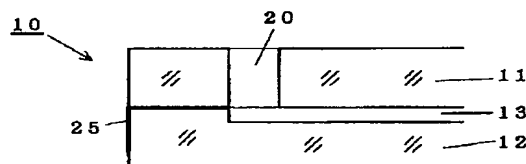
25、26、27、28…薄膜電極

30…充填剤

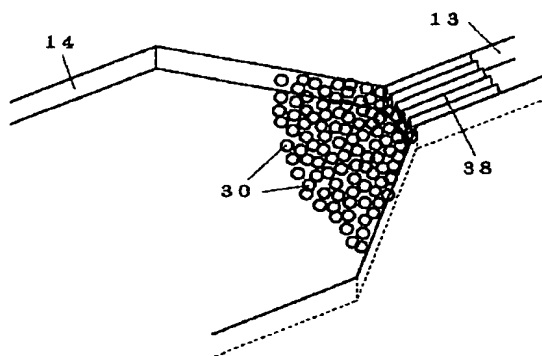
31…フリット

38…障害物

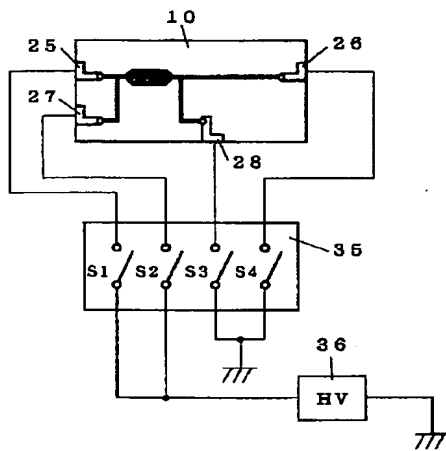
【図2】



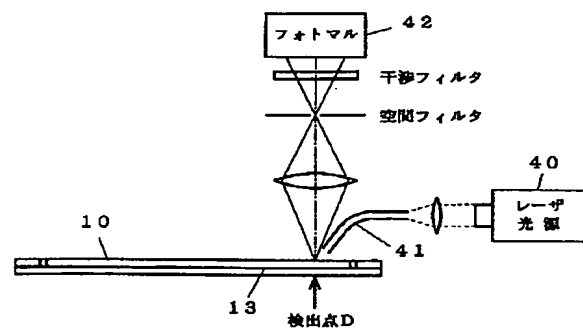
【図5】



【図 4】



【図 6】



【図 7】

